Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. F. Lembeck

Ausbeute an Substanz P aus dem Hirn verschiedener Tierspezies bei Anwendung zweier Extraktionsverfahren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ulf-Heinrich Knabe
aus Weimar

1968

9667

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547604_0035

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. F. Lembeck

Ausbeute an Substanz P aus dem Hirn verschiedener Tierspezies bei Anwendung zweier Extraktionsverfahren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ulf-Heinrich Knabe
aus Weimar

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. W. Graumann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Lembeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Betz

Herrn Professor Dr. med. F. Lembeck
danke ich für die Überlassung des
Themas und die großzügige Unterstützung
meiner Arbeit.

1.00 EINLEITUNG

2.00 METHODIK

2.10 Material

2.20 Substanzen

2.31 Extraktion nach v. EULER und GADDUM

2.32 Chloroform-Methanol-Extraktion

2.33 Extrakte aus Froschhirn

2.40 Biologische Tests

2.50 Inkubation mit Chymotrypsin

2.60 Säulenchromatographie

2.70 Papierchromatographie

2.80 Biometrie

3.00 ERGEBNISSE

3.10 Ausbeute bei Rind, Kaninchen und Maus

3.20 Einfluß von Eserin auf den Gehalt an Substanz P im Kaninchenhirn

3.31 Frisches Froschhirn

3.32 Acetongetrocknetes Froschhirn

3.33 Säulenchromatographie

3.34 Papierchromatographie

3.35 Inaktivierung mit Chymotrypsin

4.00 DISKUSSION

5.00 ZUSAMMENFASSUNG

6.00 ABBILDUNGEN UND TABELLEN

7.00 LITERATUR

1.00 EINLEITUNG

Substanz P (= SP) ist ein Polypeptid, das hauptsächlich in Nervengewebe vorkommt. Sie wurde zuerst von v. EULER und GADDUM (1931) als "unidentified depressor substance" beschrieben, die sie aus zerkleinertem Hirngewebe durch schwefelsaure alkoholische Extraktion gewonnen hatten. Später wurde Substanz P im allgemeinen nach v. EULER (1942) hergestellt (s. auch: PERNOW 1953 und GADDUM 1964). Dabei wird das Protein durch Kochen im sauren Milieu denaturiert und danach die Substanz-P-haltige Fraktion mit Ammoniumsulfat gefällt.

AMIN, CRAWFORD und GADDUM (1954) entfernten erst Serotonin aus dem homogenisierten Gehirn durch Extraktion mit Aceton. Aus dem getrockneten Rückstand konnten sie Substanz P wie oben angegeben gewinnen.

LEACH (1959) behandelte diesen acetongetrockneten Rückstand mit n-Butanol und erzielte dadurch eine höhere Ausbeute an Substanz P als ohne diese Behandlung. Sie vermutete, daß Substanz P aus einem Lipoprotein abgespalten wird.

HEIZMANN, LEMBECK und SEIDEL gaben 1966 einen weiteren Extraktionsweg für Substanz P an: Aus der mit Chloroform-Methanol extrahierten Proteolipid-Fraktion (FOLCH und LEES 1951) des Hirns gewannen sie Substanz P durch die v. EULER-sche Extraktionsmethode.

Die Anreicherung von Substanz P aus rohen Extrakten erfolgt durch Eisessig-Aether-Fällung, Säulenchromatographie, Gel-

filtration und Gegenstromverteilung. (PERNOW 1953, BOISSONNAS et al. 1963, ZUBER und JAQUES 1962, HAEFELY und HÜRLIMANN 1962 und ZUBER 1965).

In der vorliegenden Arbeit wird der Gehalt an Substanz P im Hirn verschiedener Tierspezies (Rind, Kaninchen, Maus und Frosch) im Vergleich zwischen den Verfahren nach v. EULER (1942) sowie HEIZMANN et al. (1966) untersucht, um zu prüfen, ob sich Substanz P mit diesen Extraktionsverfahren auch bei anderen als den von HEIZMANN et al. untersuchten Spezies (Mensch und Schwein) in gleicher Menge gewinnen läßt.

Es werden ferner die Versuche von RADMANOVIC (1964) wiederholt, der nach s.c. Injektion von Eserin ein starkes Absinken der Substanz-P-Aktivität im Hirn von Kaninchen festgestellt hatte. Auch hier werden die Verfahren nach v. EULER (1942) und HEIZMANN et al. (1966) vergleichend angewendet.

2.00 METHODIK

2.10 Material

Zur Untersuchung kamen Hirne vom Rind, von Kaninchen, Mäusen und Fröschen (Rana temporaria). Das Hirn wurde unmittelbar nach dem Tode der Tiere entnommen und verarbeitet.

Das Rinderhirn wurde in Groß- und Stammhirn getrennt, grob homogenisiert, in Portionen zu je 10 g abgeteilt und bis zur Verarbeitung bei -18° C eingefroren.

Zu den Versuchen mit Kaninchen dienten Tiere von 2 - 3 kg ohne Berücksichtigung der Rasse. Da das Kleinhirn keine nennenswerte Substanz-P-Aktivität enthält (CROSSLAND 1962), wurden nur Groß- und Stammhirn zur Extraktion verwendet, und zwar je eine Hirnhälfte (= ca. 4 g) für jedes der beiden Extraktionsverfahren (s. 2.31 bzw. 2.32).

Von Mäusehirn wurden jeweils 20 Hirnhälften ohne Kleinhirn einerseits nach v. EULER, andererseits mit Chloroform-Methanol extrahiert (für jeden Versuch etwa 3,5 g Hirn).

Frisch entnommene Froschhirne wurden nach Gewicht auf die beiden Extraktionsverfahren verteilt.

Ferner wurden Versuche mit Froschhirn angestellt, das nach AMIN et al. mit Aceton extrahiert worden war: Das Hirn der decapitierten Frösche wurde mit einer Glaskanüle in die zwanzigfache Menge trockenen Acetons gesaugt, zwei Tage stehen gelassen, das Aceton abgegossen und der Rückstand im

Vacuum getrocknet. Dieses Material, das uns Herr Prof. Dr. KNOLL (Pharmakologisches Institut der Medizinischen Universität Budapest) in dankenswerter Weise überlassen hatte, stammte von insgesamt 4 000 Fröschen und wog 14,1 g. Über die weitere Verarbeitung siehe 2.31, 2.32 und Abb. 1.

2.20 Substanzen

Als Standard diente ein Substanz-P-Präparat der Firma Sanabo, Wien, das nach PERNOW (1953) aus Rinderdarm hergestellt war und 13,2 Einheiten Substanz P (E. SP) je mg enthielt. Bradykinin (Präparat BRS 640) verdanken wir der Firma Sandoz, Basel. Physalaemin überließ uns Fr. Dr. Anastasi, Firma Farmitalia, Milano. Kristallisiertes α-Chymotrypsin stammte von Firma Boehringer, Mannheim. Zur Säulenchromatographie wurde Al_2O_3 "sauer" der Firma Woelm, Eschwege, verwendet, das durch Zusatz von Wasser auf die Aktivitätsstufe V gebracht worden war.

2.31 Extraktion nach v. EULER und GADDUM (= "GE")

Das Gewebe wurde mit dem vierfachen Volumen 0,1 n HCl homogenisiert und zehn Minuten gekocht. Nach Einstellung auf pH 5,5 mit n NaOH wurde zentrifugiert, der klare Überstand (10 bis 15 ml) im Rundlaufverdampfer auf 3 - 5 ml eingeengt und danach die Lösung auf pH 8 gebracht. Dann wurde das vierfache Volumen absoluten Alkohols zugesetzt, der entstehende Niederschlag abzentrifugiert, dieser nochmals in 2 ml Wasser aufgenommen, 8 ml Alkohol zugesetzt und erneut zentrifugiert. Die vereinigten alkoholischen Überstände wurden mit 1 n HCl auf pH 4 eingestellt und im Rundlaufverdampfer getrocknet. Der Rückstand wurde in 10,0 ml Wasser gelöst, mit 5,32 g Ammoniumsulfat versetzt und über Nacht bei $+4^{\circ}$ C stehen gelassen. Der Niederschlag (Laborbezeichnung "GE") wurde abzentrifugiert und zur biologischen Testung in 10,0 ml Tyrode-Lösung aufgenommen.

2.32 Chloroform-Methanol-Extraktion (= "CM")

Das Gewebe wurde mit der fünffachen Menge eines Gemisches von Chloroform-Methanol 2 : 1 (v/v) homogenisiert, zentrifugiert und filtriert. Das Filtrat wurde mit 1/5 des Volumens Wasser gewaschen, zentrifugiert, der wäßrige Überstand abpipettiert und verworfen. Die Chloroform-Phase wurde im Luftstrom bei Zimmertemperatur getrocknet, in 10,0 ml 0,1 n HCl aufgenommen, 10 min gekocht und zentrifugiert. Der trübe Überstand wurde mit 1 n NaOH auf pH 5,5 eingestellt. Der dabei aufgetretene feinflockige Niederschlag wurde abzentrifugiert und der klare Überstand im Rundlaufverdampfer getrocknet (Laborbezeichnung "CM"). CM wurde zum biologischen Test in 5,0 ml Tyrode-Lösung gelöst.

2.33 Extrakte aus Froschhirn

Bei der Extraktion von Froschhirn kamen die Verfahren 2.31 und 2.32 zur Anwendung. Einzelheiten siehe unter 3.31 und 3.32.

2.40 Biologische Tests

Zur Bestimmung der Substanz-P-Aktivität wurde nach LEMBECK und ZETLER (1962) verfahren. Am isolierten Meerschweinchen-Ileum in Tyrode-Lösung mit Zusatz von je 10^{-7} g/ml Atropin, Mepyramin und Methysergid wurde bei $+37^{\circ}$ C mit dem Standard-Präparat (s. 2.20) verglichen.

2.50 Inkubation von Extrakten mit Chymotrypsin

Zu Extrakten aus Froschhirn sowie Lösungen von SP-Standard, die eine je etwa 100 E. SP entsprechende Menge an biologischer Aktivität enthielten, wurden nach Einstellung auf pH 8,3 je 2 mg Chymotrypsin in 1 ml Tyrode-Lösung zugegeben. Als Kontrollen dienten Lösungen der gleichen Präparate, denen Tyrode-Lösung ohne Chymotrypsin zugesetzt war. Nach einstündiger Inkubation wurden die Lösungen 10 min gekocht und dann getestet (PERNOW 1953).

2.60 Säulenchromatographie

Bei der Säulenchromatographie wurde nach ZETLER und BALDAUF (1967) verfahren. 5,0 g Al_2O_3 (s. 2.20) wurden in 70%igem Methanol zu Säulen von 85 x 10 mm aufgeschwemmt. Die Fraktion F_a des aktiven Materials (ZETLER 1961) wurde mit 30 ml 70%igem Methanol eluiert, die Fraktion F_b mit 30 ml destilliertem Wasser und F_c mit 30 ml 0,1 n NaOH. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 4 - 5 Tropfen/min. Das Eluat wurde auf pH 5,5 eingestellt und im Rundlaufverdampfer zur Trockne eingedampft. Die getrockneten Präparate wurden zum biologischen Test in Tyrode-Lösung, zur Papierchromatographie in Wasser gelöst.

Die F_b-Fraktionen aus der ersten Säule wurden mit Methanol bis zu einer Konzentration von 70 % versetzt und dann mit 2,0 g Al_2O_3/1000 E. SP zwei Stunden bei Zimmertemperatur,

in einem Versuch zum Vergleich bei $+4^{\circ}$ C, geschüttelt und anschließend über eine zweite Al_2O_3-Säule wie oben angegeben rechromatographiert.

2.70 Papierchromatographie

Auf Papier Macherey und Nagel Nr. 2214 wurde mit n-Propanol-Eisessig-Wasser 4:1:2 (v/v/v) aufsteigend chromatographiert. Auf die etwa 10 cm breiten Blätter wurde jeweils eine 50 - 100 E. SP entsprechende Menge der Extrakte strichförmig aufgetragen. In Vergleichsuntersuchungen wurden Bradykinin und Physalaemin (je 15 µg/Blatt) verwendet. Die Chromatogramme wurden zwei Stunden äquilibriert. Die aufsteigende Chromatographie dauerte 12 - 14 Stunden. Die Blätter wurden bei Zimmertemperatur im Luftstrom getrocknet und parallel zur Startlinie in 1 cm breite durchnumerierte Streifen zerschnitten. Zum biologischen Test wurden die Streifen direkt ins Organbad getaucht.

Die Untersuchung erstreckte sich auf Extrakte aus Froschhirn (F-GE-1, F-GE-2 und F-CM-W, s. Abb.1), SP-Standard, Physalaemin und Bradykinin.

2.80 Biometrie

Die angeführten Werte geben den Mittelwert und die Standardabweichung an ($\bar{x} \pm s_x$).

3.00 ERGEBNISSE

3.10 Ausbeute bei Rind, Kaninchen und Maus (Tab. 1)

Die Extraktion nach v. EULER und GADDUM ("GE") wurde mit der Chloroform-Methanol-Extraktion in Tab. 1 verglichen. In allen Extrakten ist die Ausbeute an biologischer Aktivität bei GE etwas größer als in den CM-Extrakten. Das Verhältnis GE : CM betrug bei den hier untersuchten Säugetierspezies und den hier untersuchten Hirngebieten zwischen 1,27 und 1,6.

In allen GE-Extrakten liegt die Aktivität im Bereich der bisherigen Angaben in der Literatur (ZETLER und OHNESORGE 1957, ZETLER und SCHLOSSER 1955, GRABNER et al. 1959).

Alle Extrakte lösten am isolierten Meerschweinchen-Ileum eine schnelle Kontraktion mit anschließender schneller Erschlaffung aus.

Im Gewebe-Rückstand nach der CM-Extraktion sowie in der wäßrigen Phase beim Waschen der CM-Extrakte (s. 2.32) war in je zwei Versuchen je untersuchte Spezies keine biologische Aktivität mehr nachzuweisen.

3.20 Einfluß von Eserin auf den Gehalt an Substanz P im Kaninchenhirn

RADMANOVIC (1964) gab an, daß nach dreitägiger s.c. Injektion von 4 mg/kg/die Eserin die SP-Aktivität im Hirn von Kaninchen von 19,0 ± 1,5 auf 7,0 ± 0,73 E.SP/g Hirn fällt. Bei den vorliegenden Versuchen starben auf die von RADMANOVIC angegebene Dosis zwei von drei Tieren. Erst nach Reduktion der Dosis auf 2 x täglich 1,5 mg/kg Eserin überlebten alle Versuchstiere.

Bei den so behandelten Tieren lag der SP-Gehalt des Hirns bei 68,25 ± 9,1 E.SP/g Hirn gegenüber 53,4 ± 8,0 bei den unbehandelten Kontrollen bei GE-Extraktion. In den CM-Extrakten veränderte sich die Ausbeute unwesentlich von 46,7 ± 9,5 E.SP bei unbehandelten Kaninchen auf 42,6 ± 16,2 E.SP/g Gewebe. Der Anstieg der Aktivität in GE ist signifikant ($p < 0,01$). Diese Befunde stehen im Gegensatz zu denen von RADMANOVIC. Die Relation "GE:CM" erhöhte sich unter Eserin von 1,16 auf 1,82. ($0,05 > p > 0,01$)

3.31 Frisches Froschhirn (Tab. 1)

Bei den Versuchen mit frischem Froschhirn zeigte sich ein großer Unterschied in der Ausbeute an biologisch aktiver Substanz zwischen den beiden Extraktionsverfahren: Mit dem Extrakt nach v. EULER und GADDUM (F-GE-1) wurde fast fünfmal so viel aktive Substanz wie aus F-CM-O gewonnen. Wenn die beim Waschen des F-CM-O-Extraktes erhaltene wäßrige Phase F-CM-W getrocknet und wie die Chloroform-Phase im Sauren gekocht wurde (s. Abb. 1), so konnte in diesem Extrakt F-CM-W nochmals fast die gleiche Menge an biologisch aktiver Substanz nachgewiesen werden wie in F-CM-O, nämlich 92,2 $\pm$ 12,3 E.SP/g Hirn. Dieses Verhalten ist verschieden von dem der Extrakte aus Säuger-Hirn (s. 3.10).

3.32 Acetongetrocknetes Froschhirn (Abb. 1, Tab. 2)

Dieses Material lieferte sehr verschiedene Mengen an Aktivität zwischen F-GE-1 und F-CM-O. Wurde der Gewebsrückstand nach vorheriger CM-Extraktion (s. 2.32) anschließend nach der GE-Methode aufgearbeitet (s. 2.31), so enthielt dieser Extrakt F-GE-2 nochmals eine große Menge an aktiver Substanz, deren Aktivität etwa 2/3 der Aktivität von F-GE-1 betrug. In F-CM-O erschien in diesem Material nur sehr wenig biologisch aktive Substanz, in F-CM-W fast nichts.

Alle Extrakte aus Froschhirn führten am isolierten Meerschweinchen-Ileum ebenfalls zu einer schnellen Kontraktion,

aber der Darm erschlaffte danach wesentlich langsamer als nach Zugabe der anderen Präparate und des SP-Standards. (S. Abb. 2)

3.33 Säulenchromatographie (Tab. 3 a u. b, Tab. 4)

Die Präparate F-GE-1 und F-GE-2 aus Froschhirn sowie SP-Standard wurden auf die Al_2O_3-Säulen aufgetragen und nach ZETLER (1967) eluiert (s. 2.60).

Bei der Elution konnten Unterschiede zwischen SP-Standard und Extrakten aus Froschhirn festgestellt werden. Vom SP-Standard konnten in F_a und F_b zusammen etwa 90 % der eingesetzten Aktivität wieder gewonnen werden. Bei beiden Froschhirn-Extrakten (F-GE-1 und F-GE-2) entfielen auf F_a kaum nachweisbare Mengen ($<$ 10 %) an biologisch aktiver Substanz, auf F_b wechselnde Mengen (14 - 25 %). Diese Ergebnisse änderten sich auch nicht, wenn statt 30,0 ml Elutionsmittel 100,0 ml verwendet wurden oder bei Durchführung der Versuche bei +4° C. Bei keinem Präparat konnten meßbare Mengen von F_c eluiert werden (Tab. 3 a). Deshalb wurde bei den weiteren Versuchen (Tab. 3 b) auf die Elution mit NaOH verzichtet.

Die F_b-Fraktionen wurden nach zweistündigem Schütteln mit Al_2O_3 auf der Al_2O_3-Säule nach ZETLER und BALDAUF (1967) rechromatographiert (s. 2.60). Vom SP-Standard wurden 50 - 60 % der eingesetzten Aktivität als F_a eluiert, 15 - 20 % als F_b, insgesamt 66 - 80 %. Die Rechromatographie der aktiven Fraktionen von F-GE-1 und F-GE-2 ergab wieder nur in F_b wechselnde Ausbeuten (zwischen 8 und 33 %). Auch hier änderte die Durchführung eines Versuchs bei +4° C anstatt bei Zimmertemperatur nichts am Ergebnis.

Die Präparate F-CM-W und F-CM-O aus Froschhirn enthielten zu wenig Aktivität zur Säulenchromatographie.

3.34 Papierchromatographie (Abb. 3)

Bei der Papierchromatographie verhielten sich die einzelnen Präparate verschieden.

Die Fraktionen F_a und F_b des SP-Standards sowie Physalaemin und Bradykinin ergaben jeweils nur eine Zone mit biologischer Aktivität. Die Präparate aus Froschhirn trennten sich in zwei oder drei aktive Zonen auf. Die Aktivität lag jeweils über 2 - 3 Streifen verteilt. Der Rf-Wert wurde nach den Streifen mit der höchsten Aktivität bewertet.

Die Rf-Werte waren für SP-Standard-F_a 0,62 $\pm$ 0,02, für F_b 0,60 $\pm$ 0,02, für Physalaemin 0,82 $\pm$ 0,01 und für Bradykinin 0,52 $\pm$ 0,01. Eine Fraktion der Froschhirn-Extrakte F-GE-1, F-GE-2 und F-CM-W blieb an der Startlinie liegen. Die zweite, deren Aktivität etwa gleich hoch war, lief bis zur Mitte der Chromatogramme. Die dritte Fraktion, die allerdings nicht auf allen Chromatogrammen nachgewiesen werden konnte, wanderte fast bis zur Laufmittelfront.

Zwischen F-GE-1 und F-GE-2 konnte hier keinerlei Unterschied festgestellt werden. Auch durch Chromatographie auf der Al_2O_3-Säule wurde das Verhalten beider Extrakte bei der Papierchromatographie nicht wesentlich beeinflußt.

Zur Papierchromatographie der Fraktion F-CM-O stand nicht genügend Material zur Verfügung.

3.35 Inaktivierung der Extrakte mit Chymotrypsin

In den mit Chymotrypsin inkubierten Lösungen von SP-Standard sowie Extrakten aus Froschhirn (F-GE-1, F-GE-2 und F-CM-W) war keinerlei biologische Aktivität mehr nachzuweisen, während die ohne Chymotrypsin inkubierten Kontrollen nie mehr als 50 % ihrer Aktivität eingebüßt hatten.

4.00 DISKUSSION

HEIZMANN et al. (1966) extrahierten mit der GE- und der CM-Methode (s. 2.31 bzw. 2.32) aus menschlichem Hirn die gleiche Menge an Substanz P, ebenso aus Schweinehirn.

In den vorliegenden Versuchen wurde mit der CM-Extraktion aus Rinderhirn sowie Hirn von Kaninchen und Mäusen - bezogen auf das Frischgewicht des Gewebes - eine um 15 - 35 % geringere Ausbeute erzielt als mit der GE-Extraktion. Diese Unterschiede erklären sich wahrscheinlich mit unterschiedlichen Verlusten bei der Aufarbeitung.

ZETLER stellte 1961 fest, daß man aus SP-Präparaten drei wirksame Fraktionen (F_a, F_b und F_c) gewinnen kann und daß sich die Fraktion F_b auf Al_2O_3-Säulen wieder in F_a, F_b und F_c spalten läßt. Die CM-Extrakte nach HEIZMANN et al. enthalten nur die Fraktion F_a.

Mit Eserin behandelte Kaninchen zeigten im Vergleich zu Kontrollen im GE-Extrakt einen höheren Gehalt an SP, im CM-Extrakt nur eine unwesentlich niedrigere Aktivität als unbehandelte Tiere. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu denen von RADMANOVIC (1964). Die Gründe für diesen Unterschied sind unbekannt.

Bei den Versuchen mit Froschhirn fällt dagegen der Unterschied zwischen den beiden Extraktionsverfahren auf (s. Tab.1).

Während mit GE-Extraktion SP-Mengen erzielt wurden, die im Bereich der Angaben in der Literatur liegen (CORREALE 1956, GRABNER et al. 1959), sind in den CM-Extrakten nur etwa 20 % dieser Aktivität nachzuweisen. Man könnte einwenden, daß mit CM eine andere aktive Substanz als SP extrahiert wird. Die bisherigen Befunde bei Extrakten von Warmblütergehirn sprechen jedoch dagegen: Im Rückstand nach der CM-Extraktion war keine SP-Aktivität mehr zu finden (s. 3.10), beide Verfahren liefern annähernd gleiche Ausbeuten (s. Tab. 1), und schließlich berichten HEIZMANN et al. über gleiches Verhalten der aktiven Fraktionen bei Papierchromatographie und Elektrophorese.

Das ließ vermuten, daß im Froschhirn neben Substanz P weitere darmaktive Substanzen vorhanden sind. In der Tat zeigt der GE-Extrakt aus Froschhirn ein vom SP-Standard abweichendes Verhalten:

1) Das Meerschweinchen-Ileum erschlafft nach schneller Kontraktion auf Froschhirn-Extrakte viel langsamer als bei allen anderen hier getesteten Substanzen (Abb. 2).

2) Aus dem Rückstand des Froschhirns nach der CM-Extraktion (s. Abb. 1) läßt sich mit GE-Extraktion etwa 80 % der gesamten Aktivität extrahieren. Bei den Gehirnen von Säugern fand sich in diesem Rückstand keine Aktivität mehr.

3) Mit CM war nur sehr wenig (maximal 20 %) der Gesamtaktivität zu extrahieren.

4) Die Froschhirn-Extrakte F-GE-1 und F-GE-2 ließen sich aus der Al_2O_3-Säule zum größten Teil mit Wasser eluieren (entsprechend ZETLERs Fraktion F_b); mit 70 %igem Methanol (entsprechend F_a) konnte nur sehr wenig Aktivität eluiert werden (maximal 10 %), mit NaOH praktisch nichts. Auch bei Rechromatographie an Al_2O_3 tauchte keine Fraktion F_a auf, ein wesentlicher Unterschied gegenüber SP-Extrakten aus Warmblütergehirn (ZETLER und BALDAUF 1967); dies ist wesentlich, da man als SP wohl am ehesten die Fraktion F_a ansprechen kann (LEMBECK und STARKE 1968). Die Gesamtausbeute an der Al_2O_3-Säule lag zum Unterschied von SP-Standard (90 %) bei nur 20 - 30 %. Eine Abnahme der Wirksamkeit der Froschhirn-Extrakte bei Raumtemperatur kommt nicht in Betracht, denn auch bei Ausführung der Versuche bei $+4^{\circ}$ C änderte sich die geringe Ausbeute nicht. Auch mangelhafte Elution kann dafür nicht verantwortlich gemacht werden, denn auch bei Elution mit der dreifachen Menge der Elutionsmittel konnte die Ausbeute nicht gesteigert werden.

5) Die Froschhirn-Extrakte ergaben bei der Papierchromatographie zwei bzw. drei aktive Zonen. Eine dieser Zonen hatte zwar einen ähnlichen Rf-Wert wie der SP-Standard, doch sprechen die o.a. Befunde eher gegen eine Identität. Die Extrakte aus Froschhirn konnten in der vorliegenden Reinheitsstufe deutlich von Physalaemin getrennt werden, aber nicht von Bradykinin und SP-Präparaten. Allerdings könnten sich die Rf-Werte bei weiterer Reinigung der

Extrakte noch ändern. Die Extrakte F-GE-1 und F-GE-2 verhielten sich in allen Versuchen genau gleich.

Es scheint also, als ob die Hauptmenge an aktiven Substanzen im Froschhirn nicht mit SP identisch sei. Nimmt man an, daß die CM-Extraktion die gesamte im Froschhirn enthaltene SP-Aktivität liefert, so läge dieses Ergebnis mit etwa 90 E.SP/g Hirn etwa im Bereich der Ausbeute bei anderen Tierspezies. Die CM-extrahierbaren Mengen reichten aber nicht aus, um einen genaueren Vergleich mit Substanz P durchzuführen. Bei den Froschhirn-Extrakten scheint es sich auch um Peptide zu handeln, denn sie ließen sich mit Chymotrypsin völlig inaktivieren (s. 3.35).

5.00 ZUSAMMENFASSUNG

1) Zwei verschiedene Verfahren zur Extraktion von Substanz P aus dem Hirn verschiedener Tierspezies wurden angewendet. Bei der Aufarbeitung des Hirns von Rind, Mäusen und Kaninchen wird mit der Chloroform-Methanol-Extraktion nach HEIZMANN et al. etwa 2/3 der mit den herkömmlichen Verfahren extrahierbaren Menge gefunden.

2) Im Gegensatz zu den Befunden von RADMANOVIC (1964) war bei Eserin-behandelten Kaninchen die Substanz-P-Aktivität im Hirn nicht erniedrigt.

3) Im Froschhirn konnten mit Chloroform-Methanol-Extraktion nur maximal 20 % der Gesamtaktivität gewonnen werden. Die wäßrig extrahierbare Aktivität (F-GE-1 u. 2) aus Froschhirn wies an der Al_2O_3-Säule andere Eigenschaften als Substanz P auf und ergab bei der Papierchromatographie drei aktive Fraktionen. Alle aktiven Fraktionen aus Froschhirn konnten mit Chymotrypsin abgebaut werden. Das Froschhirn enthält also mehrere nicht näher definierte biologisch aktive Peptide.

6.00 ABBILDUNGEN UND TABELLEN

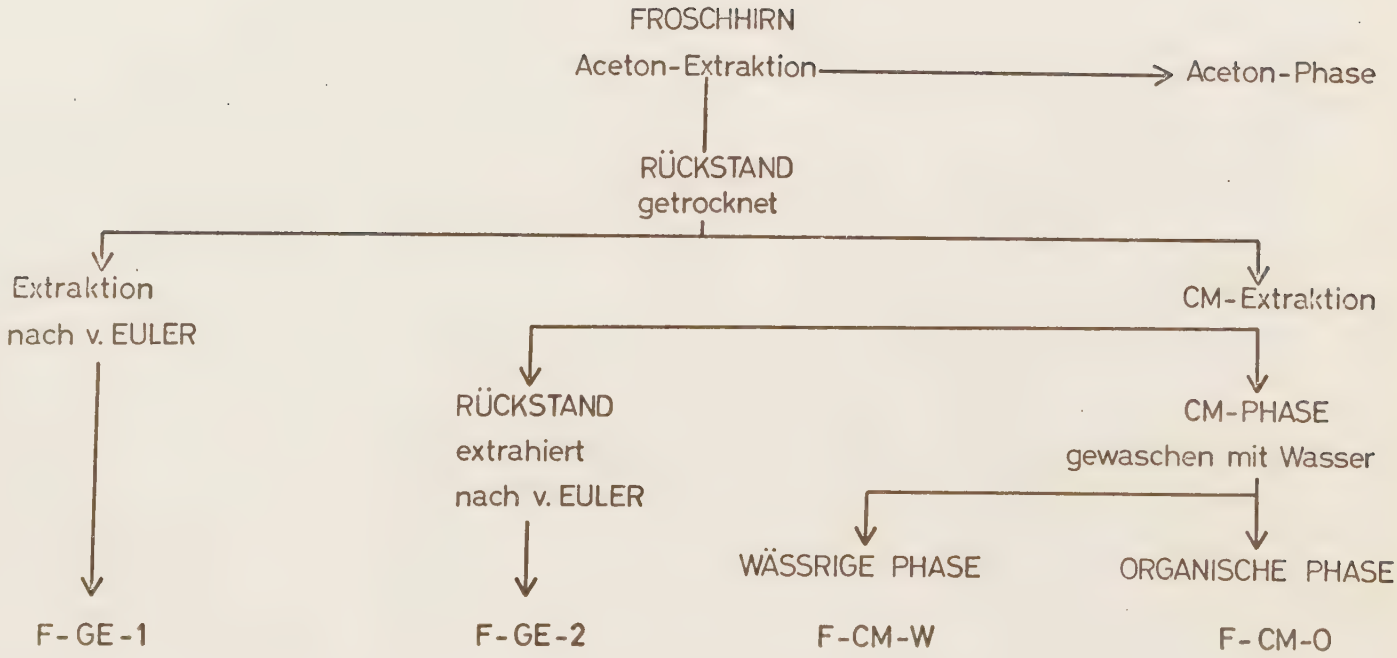

Abb.1 Verarbeitungsgang des acetongetrockneten Materials.

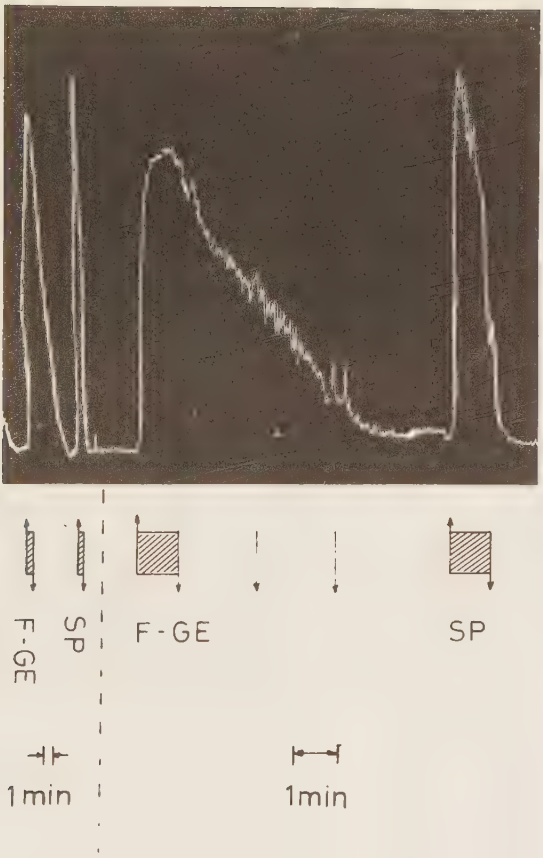

Abb. 2: Vergleich der Kontraktionskurven von F-GE und SP-Standard-Präparat

↑ = Zugabe der Extrakte

↓ = Auswaschen

□ = Einwirkungszeit

Abb.3 Papierchromatographie

TIERSPEZIES	N	GE	CM	GE : CM
MAUS	8	54,4 ± 9,1	42,7 ± 7,9	1,27
RIND Großhirn	9	8,7 ± 1,9	6,0 ± 1,9	1,45
Stammhirn	10	36,3 ± 5,9	28,1 ± 10,0	1,29
KANINCHEN unbehandelt	8	53,3 ± 8,4	46,7 ± 9,5	1,14
Eserin - behandelt	8	68,3 ± 9,1	42,6 ± 16,2	1,6
FROSCH	6	440,8 ± 67,5	92,6 ± 14,6	4,75

Tabelle 1: Ausbeuten an Substanz P aus dem Hirn verschiedener Tierspezies. GE = Extrakt nach v. EULER, CM = Chloroform - Methanol - Extrakt. Angaben in E.SP/g Frischgewebe. N = Anzahl der Extrakte.

Versuch Nr.	eingesetzte Menge Extrakt in mg	Gesamtausbeute in E. SP			
		F-GE-1	F-GE-2	F-CM-O	F-CM-W
1	3500	22000	16000	500	100
2	675	450	360	15	0
3	675	275	250	20	0
4	675	300	225	35	10
5	675	200	150	15	10

Tabelle 2: Ausbeute an biologisch aktiver Substanz aus acetongetrocknetem Froschhirn.

Präparat	Einsatz E.SP	F_a E.SP	F_a %	F_b E.SP	F_b %	F_c E.SP	F_c %	Gesamt-ausbeute % $F_a + F_b + F_c$
F-GE-1	500	0	0 %	125	25 %	20	5 %	30 %
F-GE-2	500	50	10 %	100	20 %	0	0 %	30 %
SP-Standard	500	150	30 %	300	60 %	0	0 %	90 %

Tabelle 3a: Säulenchromatographie von Präparaten aus acetongetrocknetem Froschhirn. (1 Versuch)

Präparat	Einsatz E. SP	F_a E. SP	F_a %	F_b E. SP	F_b %	Gesamt-ausbeute $F_a + F_b$	N
F-GE-1	2000	4	0,2 %	354 ± 81,7	18 %	18 %	5
F-GE-2	2000	18	0,9 %	280 ± 54,1	14 %	15 %	5
SP-Standard	2000	287 ± 77	15 %	1635 ± 89,5	80 %	95 %	5

Tabelle 3b: Säulenchromatographie von Präparaten aus acetongetrocknetem Froschhirn und des SP-Standards.
N=Anzahl der Versuche.

Präparat	aufgetr.	F_a	%	F_b	%	Gesamt-elution	%
F-GE 1	500	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	50	33	50	33
	1000	0	0	80	8	80	8
F-GE 2	500	0	0	60	12	60	12
	180	0	0	60	33	60	33
	500	0	0	40	8	40	8
SP-	1000	500	50	160	16	660	66
Standard	1500	800	53	320	21	1120	74
	1500	1000	67	200	13	1200	80

Tabelle 4: Rechromatographie der Fraktionen F_b aus der Säulenchromatographie nach zweistündigem Schütteln mit 2,0 g Al_2O_3 / 1000 ESP
Angabe der eluierten Aktivität in E. SP.

7.00 LITERATUR

AMIN, A.H.; T.B.B. CRAWFORD and J.H. GADDUM: The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. J. Physiol. (Lond.), 126, 596 (1954)

BOISSONNAS, R.A.; J. FRANZ and E. STÜRMER: On the chemical characterisation of substance P. Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 376 (1963)

CORREALE, P.: Presenza di sostanza P nell' encefalo di rana. Arch. ital. Sci. farmacol. 6, 223 (1956)

CROSSLAND, J.: Some possible mediators of non-cholinergic central transmission. In: ELLIOT, PAGE, QUASTEL: Neurochemistry, 2nd. edition 1962, Thomas Publ., Springfield, Ill., USA

EULER, U.S. von: Herstellung und Eigenschaften von Substanz P. Acta physiol. scand. 4, 373 (1942)

EULER, U.S. von and J.H. GADDUM: An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. J. Physiol. (Lond.), 72, 74 (1931)

FOLCH, J. and M. LEES: Proteolipides, new type of tissue lipoproteins, their isolation from brain. J. Biol. Chem. 191, 807 (1951)

GADDUM, J.H.; M. RANDIC and M.W. SMITH: An antistrychnine extract from horse intestine. J. Physiol. (Lond.), 172, 207 (1964)

GRABNER, K.; F. LEMBECK und K. NEUHOLD: Substanz P im Hirn verschiedener Spezies. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 236, 331 (1959)

HAEFELY, A. and A. HÜRLIMANN: Substance P, a highly active naturally occuring polypeptide.
Experientia (Basel) 18, 297 (1962)

HEIZMANN, A.; F. LEMBECK und G. SEIDEL: Die Gewinnung von Substanz P aus dem Lipidextrakt von Hirngewebe. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 265 (1966)

LEACH, E.: Extraction of substance P from nervous tissue. J. Physiol. (Lond.), 149, 34 P, (1959)

LEMBECK, F. und K. STARKE: Behandlung von Substanz-P-Präparaten mit Aluminiumoxid. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 259, 307 (1968)

LEMBECK, F. and G. ZETLER: Substance P, a polypeptide of possible physiological significance, especially within the nervous system. Int. Rev. Neurobiol. 4, 159 (1962)

PERNOW, B.: Studies on substance P.
Acta physiol. scand. 29, suppl. 105 (1953)

PERNOW, B.: Inactivation of substance P by proteolytic encymes. Acta physiol. scand. 34, 295 (1955)

RADMANOVIC, B.: Effects of drugs on the amount of substance P in rabbit brain. Nature (Lond.), 204, 1205 (1964)

ZETLER, G.: Zwei neue pharmakologisch aktive Polypeptide in einem Substanz-P-haltigen Hirnextrakt. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 242, 330 (1961)

ZETLER , G. und J. BALDAUF: Chromatographische Analyse eines Substanz-P-Präparates aus Gehirn. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 256, 86 (1967)

ZETLER, G. und G. OHNESORGE: Die Substanz-P-Konzentration im Gehirn bei verschiedenen Funktionszuständen des Zentralnervensystems. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 231, 199 (1957)

ZETLER, G. und L. SCHLOSSER: Über die Verteilung von Substanz P und Cholinesterase im Gehirn. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 224, 159 (1955)

ZUBER, H.: Purification of substance P.
In: ERDÖS, BACK, SICUTERI: Hypotensive peptides, 1965, Springer Verlag, New York

ZUBER, H. und R. JAQUES: Isolierung von Substanz P aus Rinderhirn. Angew. Chem. 74, 216 (1962)

Lebenslauf

Ich, Ulf-Heinrich Knabe, wurde am 15.12.1939 in Weimar geboren als Sohn des Ingenieurs Hans-Heinrich Knabe und seiner Gattin Elfriede, geb. Mann, die 1943 starb.

Ich besuchte ab 5.12.1945 die Volksschule und ab Ostern 1950 das Gymnasium. Am 24.2.1959 legte ich am Hellenstein-Gymnasium in Heidenheim/Brenz das Abitur ab.

Vom 6.4.1959 bis 30.9.1960 leistete ich Wehrdienst beim Gebirgs-Fernmeldebataillon 8 in Mittenwald/Obb. Ich wurde als Leutnant d.R. entlassen.

Vom 1.10.1960 bis 30.11.1962 arbeitete ich als Apotheker-praktikant in der Waldhof-Apotheke in Mannheim-Waldhof und der Mohren-Apotheke in Eberbach/Neckar. Am 4.10.1962 bestand ich die pharmazeutische Vorprüfung.

Vom Winter-Semester 1962/63 bis Winter-Semester 1967/68 studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Medizin. Ich bestand nach zwei Semestern die naturwissen-schaftliche und nach fünf Semestern die ärztliche Vorprüfung. Das Staatsexamen in Medizin habe ich am 8.8.1968 abgeschlossen.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 19a
Telefon 291063

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 19a
Telefon 291063